

UTILIZACION DEL METODO DE HIDROLISIS DE LOS AMILOSTATOLITOS PARA EL DIAGNOSTICO DE RESISTENCIA AL CALOR, LA SEQUIA Y LA SALINIDAD EN EL TOMATE¹

Jorge A. Sánchez^{2/*}, Ramón Orta*, Eric Calvo*, Bárbara Muñoz*, José Fresneda**

Palabras clave: *Lycopersicon esculentum*, tomate, diagnóstico precoz, sequía, salinidad, calor.

RESUMEN

Se adaptó la técnica de hidrólisis de los amilostatolitos y se comprobó su efectividad para el diagnóstico precoz de grados de resistencia al calor, la sequía y la salinidad en variedades de tomate. El fundamento teórico de esta técnica es la correlación inversa entre el grado de resistencia de las plantas y la velocidad de hidrólisis amilostatolítica en el ápice de raíces bajo condiciones ambientales extremas. La efectividad fue comprobada en 13 variedades de tomate de comportamiento agronómico bien conocido en Cuba. El método se puede usar en investigaciones sobre el mejoramiento genético de este cultivo, con ahorro de recursos materiales para la introducción de nuevas variedades de comportamiento agronómico desconocido.

ABSTRACT

Use of the amilostatolith hydrolysis method for diagnosis of resistance to heat, drought and salinity in tomato. The technique of amilostatolith hydrolysis was adapted and its effectiveness assessed in the precocious diagnosis of degrees of resistance to heat, drought and salinity in tomato varieties. The theoretical basis of this technique is the inverse correlation between degree of resistance of the plants and the speed of amilostatolith hydrolysis (starch grain hydrolysis in root apices) under extreme environmental conditions. The effectiveness was shown with 13 tomato varieties of very well-known agronomic behavior in Cuba. The method can be used in investigations about the genetic improvement of this crop, as a way of saving material resources during the introduction of new varieties of unknown agronomic behavior.

1/ Recibido para publicación el 6 de abril del 2000.

2/ Autor para correspondencia.

* Instituto de Ecología y Sistemática, Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente, (CITMA). Carretera de Varona Km 3^{1/2} Capdevila, Boyeros Apartado postal 8029, Código postal 10800, Habana, Cuba.

** Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical, "Alejandro de Humboldt", Ministerio de la Agricultura (MINAGRI), Calle 2 esq. a.1 Santiago de las Vegas, Habana 8, Cuba.

INTRODUCCION

El tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) y otras hortalizas de amplio consumo en Cuba son ejemplos de un fuerte trabajo de mejoramiento y obtención de nuevas variedades resistentes a las condiciones ambientales desfavorables para los cultivos (Muñoz y Sardiñas 1989, Domini et al. 1993, 1994, Gómez y Laterrot 1997).

Sin embargo, la introducción de nuevas variedades confronta una limitante fundamental; la imposibilidad de probarlas todas a la vez, en condiciones experimentales, debido a limitaciones materiales y humanas. Por estos motivos, el número de variedades en que puede determinarse la resistencia a la sequía y la salinidad mediante experimentos de campo, es necesariamente limitado. Los métodos fisiológicos y bioquímicos para el diagnóstico precoz adquieren, por consiguiente, mayor importancia cada día.

Henckel et al. (1970) describieron una técnica de laboratorio para el diagnóstico precoz de grados de resistencia de las plantas a la sequía y la salinidad, que constituye una herramienta útil para seleccionar y descartar potencialidades de resistencia de muchas variedades a la vez, sin necesidad de su evaluación en condiciones de campo. La técnica se basa en la correlación existente entre el grado de resistencia a cualquier factor estresante del ambiente y la velocidad de hidrólisis de los amilostatolitos (granos de almidón) en el ápice de las raíces. Esta correlación es inversa en la generalidad de las especies y variedades cultivadas; a mayor grado de resistencia, menor velocidad de hidrólisis de amilostatolitos bajo condiciones de sequía y salinidad. Para Henckel (1982) la resistencia a la sequía es una característica compleja que incluye la resistencia al calor y a la desecación.

La determinación de la resistencia a la sequía y la salinidad por el método de Henckel et al. (1970) presenta las siguientes ventajas: 1) la evaluación se realiza en un organismo completo (plántulas) y no con una parte de él; por tanto, puede utilizarse en los trabajos de selección de variedades; 2) el método permite determinar al mismo tiempo resistencia de las plantas al calor, la desecación y la salinidad; y 3) el método es sencillo, poco costoso, y exige pocos materiales y equipos.

En Cuba, los mejores rendimientos de las variedades de tomate, de mayor explotación en la agricultura, se obtienen en la campaña conocida como "época óptima" o "período invernal", que comprende las siembras realizadas del 21 de octubre al 20 de febrero (Casanova 1991). El estudio del comportamiento del tomate en diferentes condiciones ambientales del país (Gómez et al. 1988, Domini et al. 1993, Simón et al. 1994) demostró que existe una marcada influencia del ambiente sobre la expresión de rendimiento, lo que obliga a continuar la búsqueda de nuevas variedades capaces de evitar pérdidas en los rendimientos cuando crecen en condiciones climáticas adversas. El objetivo de este trabajo fue la adaptación y aplicación de la técnica de hidrólisis de amilostatolitos en el cultivo del tomate, como un mecanismo de selección que facilite la introducción de variedades en la práctica agrícola.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal y proceso de germinación

El presente trabajo se realizó con semillas frescas de 13 variedades de tomate cultivadas en Cuba (Cuadro 1) suministradas por el Laboratorio Central de Certificación de Semillas del Ministerio de la Agricultura y el Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt".

Las semillas de cada variedad a probar se colocan en placas de Petri (9 cm de diámetro) sobre papel de filtro humedecido con agua destilada estéril para incubarlas a 25°C, hasta obtener suficientes semillas germinadas (200 a 300) con raíces 1-2 cm de longitud.

Método de hidrólisis de los amilostatolitos

Tinción. Las raíces se cortan en su extremo basal y se depositan en un recipiente que contenga una solución 7:4 agua:lugol (v/v) por 15-30 seg. El tiempo de exposición a la solución colorante depende de la variedad ensayada, debe determinarse empíricamente, y está dado por el tiempo mínimo indispensable para colorear

correctamente los amilostatolitos agrupados en la zona del ápice de la raíz inmediata a la caliptra. Las raíces teñidas deben enjuagarse con agua antes de observarse al microscopio.

Evaluación. Se realizó determinando el contenido de amilostatolitos presente en cada raíz. Para Henckel et al. (1970) la cantidad de almidón estatolítico es una medida indirecta de la actividad de las enzimas hidrolíticas cuando las plántulas (semillas recién germinadas) se someten a condiciones ambientales extremas. En plantas susceptibles a la sequía, el almidón estatolítico se hidroliza con mayor rapidez.

Las raíces teñidas se colocan en agua destilada sobre portaobjetos en grupos discretos y se presionan ligeramente con el cubreobjetos hasta lograr la rotura de los tejidos. Deben disponerse en hilera para facilitar la observación de cada una al microscopio. El aumento óptimo a utilizar es 100x. La evaluación del contenido de amilostatolitos en cada raíz se realiza asignándole valores convencionales según la siguiente escala:

- 1-Ninguno o muy pocos.
- 2-Contenido medio.
- 3-Contenido máximo.

Estas evaluaciones deben ser realizadas secuencialmente por 2 observadores diferentes y promediados los valores asignados a cada raíz como única vía para minimizar el efecto subjetivo. El método inicial creado por Henckel et al. (1970) propone la valoración del contenido inicial de amilostatolitos en cada raíz utilizando una escala de 0-5. Sin embargo, la amplitud de dicha escala podría hacer más subjetiva la evaluación; por tanto, se propone utilizar la escala del 1-3.

Para descartar falsos positivos en nuestras determinaciones (contenidos amilostatolíticos elevados en la radícula de variedades susceptibles, provocados por la pérdida de la actividad de las enzimas correspondientes y no por la resistencia de éstas a los tratamientos) debe comprobarse la vitalidad de las células radicales tratadas mediante el método topográfico de Tezozolio (ISTA 1985). Para ello las plántulas tratadas se sumergen en solución acuosa de cloru-

ro de 2, 3, 5-trifenil tetrazolium al 0.1% durante 24 h a 30°C. La valoración se realiza de la siguiente forma: 1) plántulas viables, aquellas que presentan la radícula completamente teñida; y 2) plántulas muertas, aquellas donde la radícula no se tiñe o la tinción no es uniforme.

Tamaño de muestra. El tamaño mínimo estadísticamente válido para el número de raíces a observar se calcula por la siguiente fórmula:

$$N = U_p^2 / E^2 * (DE/X * 100)^2$$

Para N, número mínimo necesario de observaciones; P, probabilidad de certeza; U_p , razón de la distribución normal, $U_{95} = 1.96$; E, magnitud de la exactitud relativa; X, media aritmética de todas las determinaciones; DE, desviación estándar de las determinaciones.

$$\text{Para } P=95\% \text{ y } E=10\%: N = (1.96/10)^2 * (DE/X * 100)^2$$

Tratamientos

Calor. Las semillas germinadas de cada variedad a probar se separan en 2 grupos. El primero de ellos (grupo control) se mantiene a 25°C y alta humedad después de la germinación, mientras el otro es sometido a inmersión en agua durante 1 h a 36°C (grupo tratado). Ambos grupos deben pasar por los pasos del método de hidrólisis de los amilostatolitos.

Desecación. Las semillas germinadas de cada variedad a probar se separan en 2 grupos. El primero (grupo control) se mantiene a 25°C y alta humedad después de la germinación, mientras el otro es sometido a la exposición de un ambiente seco, logrado dentro de una desecadora con solución de NaCl al 3.85% durante 1 h, en la oscuridad a $20 \pm 2^\circ\text{C}$; al retirarse la placa de Petri de la desecadora debe añadirse agua para facilitar su posterior manipulación. Ambos grupos deben pasar por los pasos del método de hidrólisis de los amilostatolitos.

Salinidad. Las semillas germinadas de cada variedad a probar se separan en 2 grupos. El primero (grupo control) se mantiene a 25°C y alta humedad después de la germinación, mientras el

El mayor porcentaje de hidrólisis de los amilostatolitos se produjo en las variedades susceptibles a la sequía y la salinidad HC-38-80, HC-78-80, 8/6/2 y 8/6/M2 (en general, diferencias de

más del 30% respecto a sus controles), con las mayores diferencias estadísticas obtenidas (Cuadro 2). En las variedades reportadas como resistentes a la sequía INCA-17, L-3-16, L-10-3, así como en

Cuadro 2. Contenido medio de amilostatolitos en las células del ápice de las raíces para las distintas variedades de tomate.

Variedades	Medias aritméticas		Diferencias entre medias	% respecto al control	t	Grado de resistencia
	Control	Tratamiento				
HC-38-80	2.46	1.87	0.59	23.9 (calor)	***	Baja
		1.41	1.05	42.6 (sequía)	***	Baja
		1.31	1.15	46.7 (salinidad)	***	Baja
HC-78-80	2.52	1.74	0.78	30.9 (calor)	***	Baja
		1.62	0.90	35.7 (sequía)	***	Baja
		1.43	1.09	43.2 (salinidad)	***	Baja
8/6/2	2.36	1.48	0.88	37.2 (calor)	***	Baja
		1.62	0.74	31.3 (sequía)	***	Baja
		1.41	0.95	40.2 (salinidad)	***	Baja
8/6 M2	2.33	1.58	0.75	32.1 (calor)	***	Baja
		1.42	0.91	39.5 (sequía)	***	Baja
		1.40	0.93	39.9 (salinidad)	***	Baja
Campbell-28	1.80	1.54	0.26	14.4 (calor)	*	Media
		1.32	0.48	26.6 (sequía)	***	Baja
		1.31	0.49	27.2 (salinidad)	***	Baja
INCA-15	2.22	1.89	0.33	14.8 (calor)	*	Media
		1.45	0.77	34.6 (sequía)	***	Baja
		1.46	0.76	34.2 (salinidad)	***	Baja
INCA-17	1.80	1.61	0.19	10.3 (calor)	N.S.	Alta
		1.45	0.24	13.3 (sequía)	N.S.	Alta
		1.30	0.50	27.7 (salinidad)	**	Media
L-3-16	2.04	1.89	0.15	7.3 (calor)	N.S.	Alta
		1.82	0.22	10.7 (sequía)	N.S.	Alta
		1.56	0.48	23.5 (salinidad)	**	Media
L-10-3	2.13	1.98	0.15	7.4 (calor)	N.S.	Alta
		1.87	0.25	11.8 (sequía)	N.S.	Alta
		1.85	0.28	13.1 (salinidad)	N.S.	Alta
Criollo Quivicán	2.51	2.32	0.19	7.5 (calor)	N.S.	Alta
		2.28	0.23	9.1 (sequía)	N.S.	Alta
		2.00	0.24	9.5 (salinidad)	N.S.	Alta
INIFAT-28	2.24	1.94	0.30	10.7 (calor)	N.S.	Alta
		1.84	0.40	13.3 (sequía)	N.S.	Alta
		1.84	0.40	17.8 (salinidad)	**	Media
Placero	2.3	2.13	0.17	7.3 (calor)	N.S.	Alta
		2.02	0.28	12.1 (sequía)	N.S.	Alta
		1.94	0.36	15.6 (salinidad)	**	Media
C-28-V	2.22	2.06	0.16	7.2 (calor)	N.S.	Alta
		2.03	0.19	8.5 (sequía)	N.S.	Alta
		1.85	0.37	16.6 (salinidad)	**	Media

N.S. no significativo: resistentes

* Significativo para $P \leq 0.05$: resistencia media

** Significativo para $P \leq 0.01$: resistencia media

*** Altamente significativo para $P \leq 0.001$: sensibles

Criollo Quivicán, INIFAT-28, Placero y C-28-V no existen diferencias estadísticas significativas en la cantidad de amilostatolitos presente en las raíces antes y después del estrés; la hidrólisis fue solamente del 7.1-13.3%. Sin embargo, la mayoría de estas variedades bajo condiciones de salinidad, apenas presentaron resistencia media; solamente la variedad L-10-3 y Criollo Quivicán se comportaron como resistentes. Por último, las variedades Campbell-28 e INCA-15 fueron sensibles tanto a la desecación como a la salinidad y presentaron valores intermedios de hidrólisis y de significancia estadística de la diferencias, bajo condiciones de calor; por lo que, pueden considerarse de resistencia media en ésta condición de estrés.

En la época de temperaturas elevadas para la siembra del tomate en Cuba (campana de primavera-verano, enmarcada desde el 21 de febrero hasta el 20 de agosto) (Casanova 1991) las variedades HC-78-80, HC-38-80 y Campbell-28 reportadas como susceptibles o de resistencia media, respectivamente, en este ensayo disminuyen significativamente sus rendimientos cuando se compararon con INCA-17 y L-10-3 las cuales han sido seleccionadas por su adaptación a condiciones de alta temperatura (Gómez et al. 1988, Domini et al. 1994). Sam e Iglesias (1994) demostraron en siembras realizadas en condiciones normales que las variedades Campbell-28, HC-78-80 e INCA-17 tienen una producción de frutos muy similar entre ellas, pero cuando la siembra se realizó en "época no óptima" los mejores rendimientos se obtuvieron en la variedad INCA-17 reportada como resistente al calor y a la desecación en este experimento.

La correspondencia casi exacta entre nuestros resultados y la experiencia agronómica adquirida en Cuba con las mismas variedades (Gómez et al. 1988, Domini et al. 1993, 1994, Simón et al. 1994) indica que el método de hidrólisis de los amilostatolitos puede ser efectivo para el diagnóstico precoz del grado de resistencia a la sequía y a la salinidad en variedades de tomate útiles a nuestra economía, máxime si se toma en consideración su sencillez y la no necesidad de un equipamiento complejo.

Henckel et al. (1970) demostraron también, la efectividad de la técnica de diagnóstico en semilla botánica de diversas variedades de trigo (*Triticum vulgare*), avena (*Avena sativa*), mijo (*Panicum milaceum*), maíz (*Zea mays*), pepino (*Cucumis sativus*), calabaza (*Cucurbita maxima*), melón (*Cucumis melo*), y en frijol negro (*Phaseolus vulgaris*). La eficacia de la técnica se probó por primera vez en Cuba en raíces de semilla agámica provenientes de canutos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (Capote y Suárez 1977). Posteriormente, Capote y Casal (1978) aplicaron el método en semillas gámicas de una gramínea de interés para la ganadería cubana, como es el *Cenchrus ciliaris*.

Por otra parte, en el presente trabajo se observó que el porcentaje de hidrólisis de los amilostatolitos, en cualquiera de las variedades evaluadas, siempre fue superior en las condiciones de desecación y de salinidad que en las de calor. Esto podría deberse a una menor resistencia o tolerancia de los cultivos a estos 2 tipos de estrés o a la falta de ajuste del método en cuanto a factores tales como concentración de NaCl y tiempo de exposición de las plántulas. Por consiguiente, el ajuste de la técnica no sólo permitiría discriminar entre variedades resistentes y susceptibles, sino también en el grado de resistencia o susceptibilidad dentro de cada grupo.

Finalmente, cabe destacar que, aunque estos resultados corresponden con la experiencia agronómica determinada con estas variedades en Cuba, la evaluación conclusiva de la resistencia de las plantas cultivadas a cualquier factor estresante, según Henckel (1982), no sólo deberá incluir la determinación del grado de supervivencia de las plantas en ambientes desfavorables, sino también la productividad (rendimiento) y el crecimiento vegetativo de las variedades en esas condiciones. Esto sugiere que la utilización eficaz de dicha técnica en el trabajo de selección de nuevas variedades evitará la realización *a priori* de experimentos de campo con aquellas variedades que se descarten de acuerdo a los fines de los productores. Contribuyendo de esta manera a la introducción acelerada de nuevos cultivares resistentes en la práctica agrícola.

LITERATURA CITADA

- CAPOTE, S.; SUAREZ, A.S. 1977. Diagnóstico precoz de la resistencia a la sequía, en raíces de semilla agámica, por el método de hidrólisis de los amilostatolitos. *Ciencias Biológicas* 1:154-158.
- CAPOTE, S.; CASAL, L. 1978. Resistencia a la sequía en 4 variedades de *Cenchrus ciliaris*. *Ciencias Biológicas* 2:130-134.
- CASANOVA, A. S. 1991. El manejo del cultivo del tomate. Documento técnico informativo. *In: Seminario FAO sobre producción, manejo post-cosecha, procesamiento y mercados de cultivos hortícolas selectos (ajo, cebolla y tomate)*. FAO, La Habana, Cuba, p. 19-22.
- DOMINI, M.; PINO, M. A. E.; BERTOLI, M. 1993. Nuevas variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) para la época no óptima. *Cultivos Tropicales* 14(2-3):94-97.
- DOMINI, M.; PINO, M.A.E.; BERTOLI, M. 1994. Comportamiento de variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) para siembras de primavera. *Cultivos Tropicales* 15 (2):57-59.
- GOMEZ, O.; DEPESTRE, T.; HERNANDEZ, J.C. 1988. Obtención de una variedad de tomate adaptada a las condiciones de calor y humedad. *Agrotecnia de Cuba* 20(2):11-13.
- GOMEZ, O.; LATERROT, H. 1997. La lucha genética como parte de la lucha integrada en el concepto de sostenibilidad. *In: III Encuentro Nacional de Agricultura Orgánica, Universidad Central de las Villas, Cuba*. p. 45-49.
- HENCKEL, P.A. 1982. Diagnóstico de la resistencia al calor y la sequía en plantas cultivadas. *In: Fisiología de la resistencia de las plantas al calor y la sequía*. [en ruso]. Nauka, Moscú. 280 p.
- HENCKEL, P.A.; ADANOVA, K.A.; LEVIN, V.V. 1970. Acerca de un nuevo método de laboratorio para el diagnóstico de la resistencia al calor y a la sequía con fines de selección [en ruso]. *Fisiología Vegetal (Moscú)* 17(2):431.
- ISTA (International Seed Testing Association) 1985. International rules for seed testing. *Seed Science Technology* 13:327-328.
- MUÑOZ, L.; SARDIÑAS, J. 1989. Mejoramiento y producción del pepino para diferentes épocas. Reporte de Investigación del Instituto de Investigaciones Fundamentales en la Agricultura Tropical, 19 p.
- RICK, C.M. 1983. Genetic resource. *Plant molecular biology report* 1(2):81-87.
- SAM, O.; IGLESIAS, L. 1994. Caracterización del proceso de floración-fructificación en variedades de tomate en 2 épocas de siembra. *Cultivos Tropicales* 15(2):34-43.
- SIMON, M.; MOYA, C.; FONSECA, N. 1994. Comportamiento de variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) en condiciones de primavera. *Cultivos Tropicales* 15(1):69-72.